

## BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

## RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page.

## TO DEPOSITOR:

Name: Kikkoman Corporation  
Representative: Yuzaburo MOGI  
Address: 250, Noda, Noda-shi, Chiba

1c713 U.S. PTO  
09/801734  
03/09/01

## 1 . IDENTIFICATION OF MICROORGANISM

Identification Reference Given by the Depositor:  
Aspergillus sojae TFLAAH2

Accession Number:  
FERM BP-7478

## 2 . A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION

The microorganism identified under 1 above was accompanied  
by a document stating the following item(s).

- ☐ A Scientific Property  
☒ Taxonomic Position

## 3 . RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism  
identified under 1 above, which was received on March 8, 2000.  
(date of the original deposit)

## 4 . RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER

This International Depositary Authority received the microorganism  
under 1 above on March 8, 2000 (date of the original deposit), and  
received on March 2, 2001, a request for transfer from the original  
deposit to the deposit under the Budapest treaty.  
(Transferred from FERM P-17770 deposited on March 8, 2000)

## 5 . INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Representative: Shinichi Ohashi (sealed)  
Dr. DIRECTOR-GENERAL.

Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan  
Date: March 2, 2001

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2000年 3月 9日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2000-064739

出 願 人  
Applicant(s):

キッコーマン株式会社



2001年 2月 2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特2001-3004305

【書類名】 特許願

【整理番号】 P2139

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 1/14

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県野田市野田 2 5 0 番地キッコーマン株式会社内

    【氏名】 海附 玄龍

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県野田市野田 2 5 0 番地キッコーマン株式会社内

    【氏名】 佐藤 洋枝

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県野田市野田 2 5 0 番地キッコーマン株式会社内

    【氏名】 杉下 操

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県野田市野田 2 5 0 番地キッコーマン株式会社内

    【氏名】 福島 弥一

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県野田市野田 2 5 0 番地キッコーマン株式会社内

    【氏名】 小山 泰二

【特許出願人】

    【識別番号】 000004477

    【氏名又は名称】 キッコーマン株式会社

    【代表者】 茂木 友三郎

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 027993

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

特 2 0 0 0 - 0 6 4 7 3 9

【プルーフの要否】      要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 多重に形質転換された麹菌及びそれを用いる調味料の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子を用いた形質転換により、親株よりもプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇していることを特徴とする麹菌。

【請求項2】 アスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・タマリに属することを特徴とする、請求項1記載の麹菌。

【請求項3】 プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子が麹菌由来である、請求項1または2記載の麹菌。

【請求項4】 親株となる麹菌を、プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子を用いて形質転換し、次いで、親株よりプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇している形質転換体を選択することを特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載の麹菌の育種法。

【請求項5】 請求項1～3のいずれかに記載の麹菌の培養物を、蛋白質に作用させることを特徴とする、調味料の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、親株よりもプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇している麹菌、その育種法及び該麹菌を用いる調味料の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

蛋白質を加水分解して調味料を得る方法としては大別すると、微生物の培養物または酵素を用いた分解による方法（以下「酵素分解法」という）と、酸を用いた化学的な加水分解による方法がある。酵素分解法としては、醤油、味噌などの伝統的な調味料生産の方法のほか、蛋白質加水分解関連の酵素を含む麹菌の培養液をグルテン等の蛋白質に作用させる方法も使われている。酸による分解法としては、塩酸を用いて、グルテン等の蛋白質を高温で処理することによって行われ

てきた。

【0003】

酵素分解法では、使用する麹菌の種類、処理条件等によっては、蛋白質の分解が十分に行われないうために、得られた調味料の呈味力が不十分であるという場合があった。この場合、呈味力を高めるために、培養物または酵素の使用量を増やすことが有効なこともあるが、コストの面からは問題があった。

【0004】

酵素分解法で、呈味力に大きく寄与する酵素としては、次の二種の酵素があげられる。蛋白質をおおまかに切断して可溶化させる働きをするプロテアーゼ、ペプチドをさらに端からアミノ酸に分解するペプチダーゼ（エキソペプチダーゼ）である。麹菌は複数のプロテアーゼ、ペプチダーゼを生産するが、蛋白質の分解において、アルカリプロテアーゼとロイシンアミノペプチダーゼの一種が主な役割をになっていることが報告されている（中台：醤研 11(2)、67-79 (1985)）。この分解法では、得られる調味料の呈味力の向上、または培養物使用量の低減をはかるために、高い酵素活性を示す麹菌を育種する必要がある。麹菌の育種には、変異処理による方法が用いられてきた。しかし、変異処理による方法では、スクリーニングに多大な労力がかかるという問題があった。

【0005】

麹菌の育種法として、窒素源によるareAの活性化能力の抑制を解除することによってプロテアーゼ活性およびペプチダーゼ活性を同時に上昇させる方法が特許出願されている（WO 99/02691）。しかしながら、この方法では、広範な遺伝子の発現を制御する因子を常に活性化された状態にしてしまうという問題があった。

【0006】

近年、麹菌由来のアルカリプロテアーゼ遺伝子がクローニングされた（特許第2671452号、特許第2888955号）。また、麹菌由来のロイシンアミノペプチダーゼ遺伝子がクローニングされ、該遺伝子で形質転換することにより、ロイシンアミノペプチダーゼの活性の高い形質転換体を得られている（特開平11-346777号）。

【0007】

しかしながら、プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子の両方を用いて形質転換することにより両酵素の活性が共に上昇している麹菌を得ようという試みはなされておらず、このような形質転換体も存在しなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、親株よりもプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇している麹菌とその育種法を提供することを課題とする。さらに、本発明は、呈味力が強い調味料の製造法を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意検討した結果、プロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇している麹菌形質転換体を育種することに成功した。この麹菌の培養物を蛋白質に作用させたところ、親株と等量の培養物の使用した場合より、全窒素濃度、全アミノ酸濃度が高い、つまり呈味力が強い調味料が得られた。本発明はこれらの知見に基づいて完成された。

【0010】

すなわち本発明は、主として以下の(1)～(3)に関する。

(1) プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子を用いた形質転換により、親株よりもプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇していることを特徴とする麹菌。

(2) 親株となる麹菌を、プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子を用いて形質転換し、次いで、親株よりもプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇している形質転換体を選択することを特徴とする、上記の麹菌の育種法。

(3) 上記の麹菌の培養物を、蛋白質に作用させることを特徴とする、調味料の製造法。

【0011】

【発明の実施の形態】

『本発明の麹菌』

本発明の麹菌は、プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子を用いた形質転換により、親株よりプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇していることを特徴とする。

## 【0012】

「麹菌」とは、分類上、麹菌に属していればいかなる菌株であってもよく、例えば、食品醸造に使用される菌株、具体的にはアスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・タマリ等が挙げられる。

## 【0013】

「プロテアーゼ遺伝子、ペプチダーゼ遺伝子」の概念には、形質転換により親株に導入された際に、麹菌の各酵素の活性を上昇させることができる核酸配列が含まれる。そのような核酸配列としては、例えば、酵素の構造遺伝子、酵素自身の活性が向上するように構造遺伝子中に変異を導入した変異型遺伝子、構造遺伝子の発現調節部位（プロモーター、ターミネーター、エンハンサー等）、発現調節部位の変異体、異なる遺伝子の発現調節部位またはその変異体、あるいはこれらを複数個連結した核酸配列が含まれる。また、核酸配列は天然由来のものでも合成物であってもよく、ゲノムDNA、cDNA、PCR断片、化学合成・半合成DNA等が使用できる。

## 【0014】

プロテアーゼ及びペプチダーゼの構造遺伝子としては、麹菌で発現・分泌可能であり、広範な基質に作用するものであれば、その由来等は特に限定されず、麹菌以外の生物種を由来とするものであってもよい。細胞内での酵素の生産効率、細胞外への分泌効率、パブリック・アクセプタンス等の点から、遺伝子は、麹菌由来であることが好ましく、例えば、麹菌由来のアルカリプロテアーゼ遺伝子（特許第2671452号、特許第2888955号）、麹菌由来のアミノペプチダーゼ遺伝子（特開平11-346777号）を用いることができる。また、各遺伝子の発現調節部位も、麹菌で働きうる他の遺伝子由来あるいは他の生物種由来のものであってもよい。

## 【0015】

本発明の麹菌は、上記の特徴を有しているものであれば、プロテアーゼ活性及



びペプチダーゼ活性は、親株に対してどのような倍率で上昇していてもよい。本発明の麹菌としては、例えば、親株よりもプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が少なくとも2倍上昇している麹菌、より具体的には実施例1に記載のアスペルギルス・ソーヤTFLAAH2株（FERM P-17770）が挙げられる。

#### 【0016】

##### 『本発明の麹菌の育種法』

本発明の麹菌は、親株となる麹菌を、プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子を用いて形質転換し、次いで、親株よりプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇している形質転換体を選択することにより得られる。

#### 【0017】

親株として使用可能な麹菌の種類、プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子は上記の通りである。また、目的の形質転換体を選択するため、本発明の育種法では、適当な形質転換マーカー遺伝子を使用することが好ましい。

#### 【0018】

親株として用いる麹菌としては、具体的には、アスペルギルス・ソーヤATCC42251株、アスペルギルス・オリゼーATCC20386株、アスペルギルス・タマリJCM2259株などが挙げられる。これらの菌株を実際に宿主株として用いるためには、使用する形質転換マーカー遺伝子の種類により、必要に応じて常法（例えばイー・シエラ（E. Shiela）等：モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス、218、99-104（1989））を用いて該マーカーを使用するための変異を導入する。使用する形質転換マーカー遺伝子は、親株やプラスミドの種類、培養条件等に応じて適宜選択すればよく、例えば、niaD、oliC31、pyrG、amdS、sC、argB遺伝子等が使用可能である。

#### 【0019】

親株に導入されるプロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子の種類・形状等も限定されず、各遺伝子を含んでいれば、PCR断片、ゲノムDNA断片、cDNA、プラスミド等のベクターに挿入された状態であってもよく、この場合、ベクターには適当な形質転換マーカー遺伝子が挿入されていることが好ましい。また、プロテアーゼ遺伝子、ペプチダーゼ遺伝子、必要によりマーカー遺伝子は、

それぞれ別の分子上に位置していてもよく、その場合は後述する共形質転換法が採用できる。

【0020】

なお、遺伝子は直鎖状、環状いずれでもよい。さらに各遺伝子の前後には、形質転換やその他の遺伝子操作を効率的に行なうための核酸配列が付加されているもよい。

【0021】

麹菌を形質転換する方法は特に限定されないが、例えば、イー・シエラ(E. Sh iela)等：モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス、218、99-104(1989)の方法が挙げられる。この方法は、液体培養した麹菌を細胞壁溶解酵素で処理することにより細胞壁を除去したプロトプラストを調製し、塩化カルシウム、ポリエチレングリコール4000存在下でプロトプラストをDNAと共にインキュベートした後、使用したマーカー遺伝子に適した選択培地でプロトプラストを再生させるものである。

【0022】

共形質転換を行う際には、目的の遺伝子が導入された株と、マーカーのみが導入された株が選択培地上で生育する。そこで、活性による選抜を行う必要がある。この高活性株を選抜する方法としては、例えば、ペーパーディスク上に菌株を生育させることにより、おおまかな活性の高低を多数の検体について容易に測定できる。具体的には、プロテアーゼとしてアルカリプロテアーゼ、ペプチダーゼとしてアミノペプチダーゼの活性を測定する場合には、例えば以下の測定法1のように行うことができる。また、選抜後に、活性を正確に測定する際には、アルカリプロテアーゼについては、ミルクカゼインを基質とした、常法（財団法人日本醤油研究所発行の「しょうゆ試験法」の方法）、アミノペプチダーゼについてはロイシルーグリシルーグリシンを基質とした、特開平11-346777記載の方法で行うことができる。

【0023】

形質転換の操作においては、プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子を同時に親株に導入してもよい。また、形質転換を二段階で実施してもよい。この場

合は、例えば、第1の遺伝子を用いて親株を形質転換し、その遺伝子がコードする酵素活性が上昇している形質転換体を選択する。次いで、第2の遺伝子を用いて該形質転換体株をさらに形質転換し、第2の酵素活性が上昇している形質転換体を選択する。

## 【 0 0 2 4 】

本発明の育種法の一例を実施例に示した。実施例では、まず、 $niaD^-$  変異を持つアスペルギルス・ソーヤを親株とし、アミノペプチダーゼ遺伝子を、 $niaD$  遺伝子と共形質転換した。得られたアミノペプチダーゼ高活性形質転換体を、アルカリプロテアーゼ遺伝子で、 $olic31$  遺伝子と共形質転換し、本発明の麹菌を得た。

## 【 0 0 2 5 】

[測定法1] 多検体のアルカリプロテアーゼ活性およびアミノペプチダーゼ活性の測定法

孢子約1000個を含む滅菌蒸留水または0.01%(W/V)Tween-20水溶液10 $\mu$ lを(盲検として、孢子を含まないものについても同時に行う)、大豆粉寒天培地[3%(W/V)加熱・加圧膨化処理した脱脂大豆粉末、1%(W/V)  $KH_2PO_4$ 、1.5%寒天末、pH6.0]上に置いた厚手・8mm $\phi$ のペーパーディスク(東洋濾紙社製)に滴下し、30℃で36~48時間培養する。菌体の付着したペーパーディスクをmlの脱イオン水が入ったサンプルチューブ(イナ・オプティカ社、RC-0170等)に移し、攪拌した後、5℃で3時間以上放置し、上清を酵素液として活性の測定を行う。

## 【 0 0 2 6 】

基質溶液は、プロテアーゼの場合、1%アソカゼイン(シグマ社製)、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)を、ペプチダーゼの場合、0.1mmolのロイシン-p-ニトロアニリドを5mlのエタノールに溶解させ、10mlの500mMトリスバッファー(pH8.5)と85mlの蒸留水を加えたものを用いる。

## 【 0 0 2 7 】

プロテアーゼの場合、50~100 $\mu$ lの酵素液を、サンプルチューブ(イナ・オプティカ社、RC-0170等)に入れ、上記プロテアーゼ基質溶液を加えて混合し、30℃で10~60分間反応させる。900 $\mu$ lの10%トリクロロ酢酸水溶液を加え、激しく混合し、15,000 $\times g$ で10分間遠心分離する。上清の400nmでの吸光

度を測定し、盲験の試料の吸光度を減じた値をプロテアーゼ活性の指標とする。

【0028】

ペプチダーゼの場合、10～50  $\mu$  l の酵素液をサンプルチューブに入れ、250  $\mu$  l の上記ペプチダーゼ基質溶液を加えて混合し、30℃で10～60分間反応を行う。900  $\mu$  l の0.1N HClを加えて激しく攪拌し、410nmでの吸光度を測定し、盲験の試料の吸光度を減じた値をペプチダーゼ活性の指標とする。

【0029】

『本発明の調味料の製造法』

本発明の調味料の製造法は、本発明の麴菌の培養物を、蛋白質に作用させることを特徴とする。本発明の方法は、麴菌を用いて製造可能な種々の調味料、例えば醤油、魚醤、味噌、動物性または植物性発酵旨味調味料等に応用可能である。麴菌の培養物は、液体培養物であっても、固体培養物であってもよい。また、培養に用いる培地の種類としては、蛋白質分解系の酵素が生産されるような条件であればどのようなものでも良い。ただし、その後に食品である調味料の生産に用いるものであるから、食品に混入することが好ましくないものは用いてはならない。

【0030】

液体培養物としては、例えば、脱脂加工大豆、小麦ふすま、醤油油を培地成分とし、通気・攪拌培養したものが挙げられる。固体培養物としては、例えば、常法により得られた醤油麴、味噌麴、または小麦ふすま麴などが挙げられる。培養時間は、培地組成、培養規模、培養温度等により異なるが、例えば、12時間～96時間、好ましくは18時間～96時間、さらに好ましくは36～72時間で行うことができる。培地pHは、pH4.5～pH9.0、好ましくはpH5.0～pH8.0が適当である。培養温度は、好ましくは20℃～40℃、さらに好ましくは25℃～35℃が適当である。

【0031】

麴菌の培養物を作用させる蛋白質は、蛋白質を含有するものであれば特に限定されないが、例えば、グルテン（小麦、ライ麦、オート麦、大麦）、丸大豆、脱脂加工大豆、精製大豆蛋白質、ミルクカゼイン、ゼラチン、魚肉、魚肉蛋白、畜

肉等、酵母などが挙げられ、それぞれ単独または組み合わせて用いられる。

【0032】

麹菌の培養物を蛋白質に作用させる方法としては、培養物と蛋白質を混合し、必要に応じて水を添加し、適当な温度で反応させれば良い。培養物は通常、そのまま用いればよいが、酵素を水等で抽出した酵素液や、さらに粗精製した酵素を用いても良い。また、醤油麹のように、培養物自体が蛋白質に富む組成の場合は、培養物に含まれる蛋白質を分解させるのみで、新たに蛋白質原料を加えなくてもよい。

【0033】

反応は、食塩やエタノールを添加して行うこともできる。食塩の濃度としては、20%以下、好ましくは15%以下が適当である。エタノールの濃度は、10%以下、好ましくは5%以下である。食塩及びエタノールは、反応開始時に全量添加しても良いが、反応中の適当な時期に、1回または複数回に分けて、または流下することにより添加しても良い。また、糖類を消費することにより色沢を安定化させることと、アルコールを生成させることにより細菌の繁殖を防ぐことを目的として、酵母を添加して反応を行うこともできる。使用する酵母としては、食塩濃度が低い場合には、パン酵母等のサッカロミセス属のものなど、食品製造に用いることのできる酵母であればよく、食塩濃度が高い場合には、チゴサッカロミセス・ルキシー等の耐塩性酵母が良い。

【0034】

麹菌の培養物を蛋白質に作用させる際の条件について温度は、4℃～60℃、好ましくは30℃～55℃さらに好ましくは、40℃～50℃で行う。時間は、通常、蛋白質の分解を行う程度の時間もしくはそれ以下で良く、好ましくは6時間～10日、さらに好ましくは1日～7日である。

また、醤油など、従来から生産されている蛋白質加水分解による調味料生産の場合には、反応は常法にしたがって行うことができる。

【0035】

反応終了後、常法により固形物を除去してもよい。固形物の除去法としては、例えば、濾過、遠心分離などが挙げられる。

【0036】

このようにして得られた調味料は、同じ量の親株の培養物を用いた場合に比べて、全窒素濃度、全アミノ酸濃度が高く、呈味力が強い。なお、全窒素濃度や、全アミノ酸濃度は常法により測定することができる。

【0037】

【実施例】

以下に実施例を示し、本説明をより具体的に説明するが、本説明はこれらによって制限されるものではない。

【0038】

[実施例1] 本発明の麹菌の取得

実施例1では、形質転換により、親株よりもアルカリプロテアーゼ活性及びアミノペプチダーゼ活性が上昇している麹菌を取得した。

1. 親株としては、アスペルギルス・ソーヤ(ATCC42251)株を使用した。ペプチダーゼ遺伝子としては、アスペルギルス・ソーヤ由来のアミノペプチダーゼ遺伝子(特開平11-34677号)を使用した。プロテアーゼ遺伝子としては、アスペルギルス・オリゼー由来のアミラーゼ遺伝子のプロモーター及びターミネーター、アスペルギルス・オリゼー由来のアルカリプロテアーゼ遺伝子(cDNA)(特許第2671452号)を接続したDNA配列を使用した。

【0039】

2. イー・シエラ(E. Shiela)等(モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス、218、99-104(1989))の方法により、親株のniaD-変異株を取得した。次いで、niaD遺伝子との共形質転換により、該niaD-変異株をアミノペプチダーゼ遺伝子で形質転換した。

以上により、ふすま麹で測定した場合に、アミノペプチダーゼ活性が親株より約5倍に上昇している形質転換体TFLW22株を得た。

【0040】

3. 上記で得られた形質転換体TFLW22株を、イー・シエラ等の方法(前出)によって、pMAR5-alp1とpMW11で共形質転換した。

pMAR5-alp1は、pMAR5(Shibuyaら、Bioscience, Biotechnology, and Biochemis

try 56(10),1674-1675 (1992)) のEcoRI切断部位にアスペルギルス・オリゼーのアルカリプロテアーゼ遺伝子(cDNA)を挿入することにより得られたプラスミドであり、上記アルカリプロテアーゼ遺伝子がpUC18上に乗せられている構造となっている。

pMW11はマーカー遺伝子であり、アスペルギルス・ニーデュランズのオリゴマイシン耐性変異遺伝子であるoliC31の載ったプラスミドpMW11(Wardら、Molecular and General Genetics 202,265-270 (1986))を、HindIIIおよびPstIでoliC31遺伝子の両側の部分で切断して使用した。

#### 【 0 0 4 1 】

共形質転換後、Czapek Dox培地(DIFCO社製)でプロトプラストを再生させ、さらに、オリゴマイシンを含むCzapek Dox培地を重層することにより形質転換体を選択した。

#### 【 0 0 4 2 】

得られた形質転換体は68株であった。共形質転換の性質上、これらの形質転換体は、oliC31遺伝子が組み込まれているものであるが、アルカリプロテアーゼ遺伝子が同時に組み込まれているものは、一部のものに過ぎない。そこで、これらの68株の形質転換体について、前述の測定法1記載の方法で、アルカリプロテアーゼの活性を測定したところ、約半数の株で活性が上昇していた。そこで、活性の高いほうから、4株を選択し、単孢子分離を行い、それぞれの株について6個のコロニーについて再びアルカリプロテアーゼ活性の測定を行った。ここで、活性の高かったコロニー3個について、さらに単孢子分離を行い、それぞれの株について8個のコロニーについてアルカリプロテアーゼ活性およびアミノペプチダーゼ活性の測定を行った。

#### 【 0 0 4 3 】

以上により、ふすま麴で測定した場合に、アミノペプチダーゼ活性が親株より約5倍、アルカリプロテアーゼ活性が約 3 倍に上昇しているアスペルギルス・ソーヤTFLAAH2株を取得した。アスペルギルス・ソーヤTFLAAH2株を、工業技術院生命工学工業技術研究所に「FERM P-17770」として寄託した。

#### 【 0 0 4 4 】

[実施例 2] 本発明の麹菌の培養物を用いた調味料の製造例

実施例 1 で得られた本発明の麹菌アスペルギルス・ソーヤ TFLAAH2 株（試験株）、親株であるアスペルギルス・ソーヤ ATCC42251（対照株）の培養物を用いて蛋白質を加水分解し、調味料を製造した。

【0045】

（製造例 1）

2 基の 30 L のジャーファーマンターに、2.5% 小麦ふすま、0.5% 脱脂大豆、0.1% (W/V) リン酸二水素一カリウム、0.4% (V/V) 醤油油を含む 20 L の培地を入れ、常法により、加圧水蒸気で殺菌した。30℃ まで冷却した後、一方のジャーファーマンターに試験株の、他方に対照株の種麹（常法により調製したふすま麹）を接種し、30℃ で 70 時間培養した。この間、pH が 6.8 以下になると水酸化ナトリウム水溶液が自動添加されるようにして、pH を 6.8 以上に保った。通気量は 0.5 VVM、攪拌回転数は 450 rpm であった。

【0046】

培養終了後、培養液の一部を濾過し、ミルクカゼインを基質としたアルカリプロテアーゼ活性の測定および、ロイシルーグリシルーグリシンを基質としたアミノペプチダーゼ活性の測定を行った。結果を表 1 に示す。表中の数値は、対照株の培養液の酵素活性を 100 とした場合の相対値である。対照株にくらべて、試験株のアルカリプロテアーゼ活性は約 3 倍、アミノペプチダーゼ活性は約 7 倍高い活性を示した。

【0047】

【表 1】

菌株	アルカリプロテアーゼ活性	アミノペプチダーゼ活性
対照株	100	100
試験株	312	698

【0048】

（製造例 2）

試験株と対照株の上記培養液を用いて分解試験を行った。20 ml 培養液、130 g 食



塩、300g小麦グルテン、800ml温水(45℃)を混合し、43℃で72時間、プロペラによる機械攪拌を行いながら加水分解を行った。これらの反応物を濾過し、濾液について全窒素濃度および全アミノ酸濃度を測定したところ表3のように、全窒素濃度、全アミノ酸濃度とも、試験区は対照区より高い値を示した。

【0049】

【表2】

菌株	全窒素濃度 (%)	全アミノ酸濃度 (%)
対照株	1. 2 1	2. 7
試験株	2. 0 4	6. 4

【0050】

(製造例3)

試験株及び対照株を用いて常法により得られた醤油麴(原料処理前の原料重量: 脱脂大豆350g, 小麦350g)に食塩140g、水を1250ml添加、混合し、43℃で60時間プロペラによる機械攪拌を行いつつ加水分解を行った。これらの反応物を濾過し、濾液を分析したところ、表3に示すように、全窒素濃度、全アミノ酸濃度とも、試験区は対照区より高い値を示した。

【0051】

【表3】

菌株	全窒素濃度 (%)	全アミノ酸濃度 (%)
対照株	1. 0 7	2. 9
試験株	1. 5 1	3. 7

【0052】

(製造例4)

試験株及び対照株を用いて常法により得られたふすま麴100gと小麦グルテン400gに食塩水1300mlを添加、混合し、43℃で72時間プロペラによる機械攪拌を行いつつ加水分解を行った。これらの反応物を濾過し、濾液を分析したところ、表4に示すように、全窒素濃度、全アミノ酸濃度とも、試験区は対照区より高い値を

示した。

【0053】

【表4】

菌株	全窒素濃度 (%)	全アミノ酸濃度 (%)
対照株	2.12	2.4
試験株	2.94	3.3

【0054】

いずれの製造例においても、本発明の麹菌の培養物を用いることにより、親株を用いた場合よりも高い呈味力を示す調味料を製造できることが示された。

【0055】

【発明の効果】

本発明によって、親株よりもプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇している麹菌とその育種法が提供された。また、本発明の麹菌の培養物を蛋白質に作用させることにより、親株を用いた場合よりも呈味力の強い調味料を得ることができた。本発明は産業上極めて有用なものである。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】親株よりもプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇している麹菌とその育種法、及び該麹菌を用いる調味料の製造法を提供すること。

【解決手段】(1) プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子を用いた形質転換により、親株よりもプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇していることを特徴とする麹菌。

(2) 親株となる麹菌を、プロテアーゼ遺伝子及びペプチダーゼ遺伝子を用いて形質転換し、次いで、親株よりプロテアーゼ活性及びペプチダーゼ活性が上昇している形質転換体を選択することを特徴とする、上記の麹菌の育種法。

(3) 上記の麹菌の培養物を、蛋白質に作用させることを特徴とする、調味料の製造法。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-064739
受付番号	50000279702
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成12年 3月10日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 3月 9日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000004477]

1. 変更年月日	1999年 8月16日
[変更理由]	住所変更
住 所	千葉県野田市野田250番地
氏 名	キッコーマン株式会社